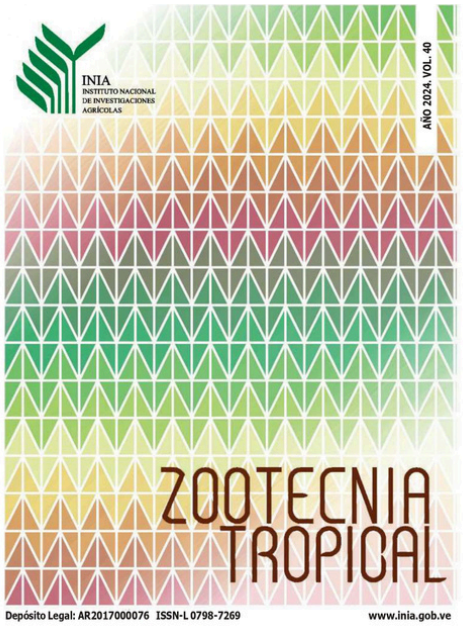
INIA
INSTITUTO NACIONAL
DE INVESTIGACIONES
AGRÍCOLAS

AÑO 2024. VOL. 40

ZOOTECNIA TROPICAL

Depósito Legal: AR2017000076 ISSN-L 0798-7269

www.inia.gob.ve



ISSN-L 0798-7269

Depósito Legal: **AR2017000076**

edicion.tecnica.zootrop@gmail.com

+58 243-2404766

Zootecnia Tropical es una revista de acceso libre, publicada con el objetivo de contribuir con la divulgación científica de información relacionada con la producción animal, con énfasis en las regiones tropicales y subtropicales, a través de la publicación de artículos originales de investigación, notas técnicas, artículos de revisión y artículos especiales.

Zootecnia Tropical se publica en volumen continuo a partir del año 2020.

Comité Editorial

Saúl Salazar	Editor Jefe
Lismar Ramírez	Editora Asistente

Diagramación y Gestión WEB

Renny Barrios	INIA - Venezuela
Sonia Piña	INIA - Venezuela

Consejo Científico Asesor

Dr. Neyo Pérez	IVIC- VENEZUELA
Dr. José Rafael Pérez	UNERG VENEZUELA
Dr. Gustavo Morales	JUBILADO INIA VENEZUELA
Dr. Adolfo Bremo	JUBILADO UNEFM
Ing. MSc. Freddy Espinoza	JUBILADO INIA VENEZUELA
Ing. Graciela Piñero	INIA VENEZUELA
Ing. MSc. Adriana Morgado	UCV VENEZUELA

Indización

Biosis Zoological Records	EUA
Agroforestry Abstracts	EUA
IICA – CIDIA	Costa Rica
Tropag & Rural	Holanda
AGRIS – FAO	Italia
LATINDEX	México
IAMSLIC	USA
PERIÓDICA	México
MEDIATHEK	Alemania
Base Agrícola Venezolana	Venezuela
Bioline International	Canadá
SCIELO	Venezuela
SCOPUS	EUA
OEI	Colombia
Citefactor	Canadá

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas

Giomar Blanco	Presidente
Rumairinn Vega	Gerente General
Josefa Valero	Gerente de Investigación
Doris Blanco	Gerente de Producción Social
José Maluenga	Gerente de Participación y Desarrollo Comunitario

Editada por la Gerencia de Investigación
Área de Gestión de la Información
Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Venezuela

ZOOTECNIA TROPICAL / VOL. 40 / AÑO 2024 / ISSN-L 0798-7269

ZOOTECNIA TROPICAL

Revista científica del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas,
Ministerio del Poder Popular para la Agricultura Productiva y Tierras
Maracay, Venezuela

http://publicaciones.inia.gob.ve/index.php/zootecniatropical

EDITORIAL

El Renacer de la Revista Zootecnia Tropical: Un Compromiso Renovado

Después de un periodo de pausa, nos llena de entusiasmo anunciar el regreso de la Revista Zootecnia Tropical. Desde nuestra última publicación en 2021, hemos trabajado arduamente para revitalizar este espacio, que por décadas ha sido una plataforma clave para el intercambio de conocimientos en zootecnia, con un enfoque en los desafíos y oportunidades propios de las regiones tropicales.

El mundo no se ha detenido, y nosotros tampoco. La zootecnia enfrenta nuevos retos y demandas: sostenibilidad, innovación tecnológica y resiliencia climática. Hoy, más que nunca, es crucial contar con un canal que conecte a investigadores, productores y técnicos, fomentando el desarrollo y la aplicación de soluciones adaptadas a nuestras realidades.

En esta nueva etapa, renovamos nuestro compromiso con la calidad, la pertinencia científica y el acceso abierto al conocimiento. Invitamos a toda la comunidad académica y profesional a unirse a este esfuerzo, ya sea como autores, revisores o lectores activos. Juntos, podemos fortalecer la base del desarrollo agropecuario en los trópicos.

¡Gracias por acompañarnos en este nuevo comienzo!

Atentamente,

Equipo Editorial

Efecto inhibidor de la Nisina sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en leche de larga duración contaminada artificialmente

María Gabriela Acosta Moreno[1], Teresita Luigi Sandoval[2,4], Legna Rojas González[3,5], Omaira Besereni Karaz[1]

[1]Laboratorio Clinico Cruz Roja Valencia. [2]Laboratorio de Prácticas Profesionales de Bacteriología, Escuela de Bioanálisis Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Venezuela. [3]Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Venezuela. [4]Centro de Investigaciones de Microbiología Ambiental (CIMA- UC). Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Venezuela. [5]Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias y Tecnología, Centro de Biotecnología Aplicada. Carabobo, Venezuela. Correo electrónico: legna9000@gmail.com

RESUMEN

La Nisina es una bacteriocina que posee propiedades antibacterianas sobre microorganismos patógenos en alimentos. Asimismo, contribuye a mejorar el valor nutricional y las características organolépticas incrementando la vida de anaquel del producto alimenticio. Con el fin de evaluar el efecto de la Nisina (500 UI/g) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (10^3 UFC/mL), se inocularon artificialmente 25 muestras de leche descremada de larga duración (UHT), bajo temperaturas de 8°C / 25°C y condiciones de pH de 4,5 / 6,5. El efecto de la Nisina sobre el microorganismo se demostró mediante recuento en placa sobre agar Baird Parker. La Nisina tuvo un efecto inhibitorio sobre *S. aureus* bajo las 2 temperaturas (8°C y 25°C) a partir de los 30 minutos de incubación (p=0,0079). En todos los tiempos evaluados, tanto a pH 4,5 como 6,5 se obtuvo disminución del recuento de *S. aureus* en presencia y ausencia de la Nisina (P<0,05). El pH 4,5 incidió negativamente en el crecimiento de *S. aureus*, sin embargo, su efecto no fue de inmediato pues se requirió más de 6 horas de incubación para lograr una inhibición completa (100 %). El presente estudio evidenció experimentalmente el efecto inhibidor de la Nisina al disminuir los recuentos de *S. aureus* en condiciones de temperatura de refrigeración, así como a pH 4,5, por lo que, bajo tales parámetros, la aplicación de la Nisina resultaría en una mayor inocuidad, así como su posible uso para la inhibición de otros microorganismos patógenos en otras matrices alimentarias.

Palabras Clave: Bacteriocinas, lácteos, microorganismos, patógenos, temperatura.

Inhibitory effect of Nisin on the growth of *Staphylococcus aureus* in artificially contaminated long-life milk

ABSTRACT

Nisin is a bacteriocin that has antibacterial properties on pathogenic microorganisms in food. It also contributes to improving the nutritional value and organoleptic characteristics, increasing the shelf life of the food product. In order to evaluate the effect of Nisin (500 IU/g) on the growth of *Staphylococcus aureus* (10^3 CFU/mL), 25 samples of long-life skimmed milk (UHT) were artificially inoculated under temperatures of 8°C / 25°C and pH conditions of 4.5 / 6.5. The effect of Nisin on the microorganism was demonstrated by plate count on Baird Parker agar. Nisin had an inhibitory effect on *S. aureus* under both temperatures (8°C and 25°C) from 30 minutes of incubation (p=0.0079). At all times evaluated, both at pH 4.5 and 6.5, a decrease in the *S. aureus* count was obtained in the presence and absence of Nisin (P < 0.05). pH 4.5 had a negative impact on the growth of *S. aureus*, however, its effect was not immediate since more than 6 hours of incubation were required to achieve complete inhibition (100 %). The present study experimentally demonstrated the inhibitory effect of Nisin in reducing *S. aureus* counts under refrigeration temperature conditions, as well as at pH 4.5, therefore, under such parameters, the application of Nisin would result in greater safety, as well as its possible use for the inhibition of other pathogenic microorganisms in other food matrices.

Key words: Bacteriocins, dairy, microorganisms, pathogens, temperature.

Recibido: 23/07/2024 - Aprobado: 14/10/2024

INTRODUCCIÓN

El peligro para la inocuidad de los alimentos constituye un factor de preocupación para la industria a nivel mundial. Desde la granja (finca) hasta la venta del producto final, pueden ocurrir diferentes fuentes de contaminación (biológica, química o física), ya sea de manera accidental o intencional, con el potencial de causar consecuencias adversas para la salud de los consumidores (Montgomery *et al*. 2020). En este sentido, la contaminación con bacterias zoonóticas y patógenos para el hombre tales como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp., y *S. aureus* (agentes biológicos) son de interés, por lo que resulta necesario buscar alternativas que disminuyan el riesgo de contaminación con dichos agentes (Owusu *et al.* 2020).

Dentro de las alternativas disponibles, se destaca el uso de bacteriocinas, siendo las producidas por las Bacterias Acido Lácticas (BAL), específicamente por los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, las que encierran un mayor interés (Rendueles *et al*. 2022). Las bacteriocinas son un grupo relativamente heterogéneo de pequeñas proteínas, o péptidos cuya actividad antimicrobiana es ejercida sobre especies estrechamente relacionadas (bacterias Gram positivas), pero no frente al organismo productor, con diferentes niveles y espectros de actividad, mecanismos de acción, peso molecular y propiedades fisicoquímicas (Vidal *et al*. 2020).

En general, actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos (Daba *et al*. 2022). Estas proteínas son efectivas y potentes frente a las bacterias zoonóticas y patógenos para el hombre como las mencionadas previamente, siendo *S. aureus*, una bacteria Gram positiva capaz de contaminar una variedad de alimentos como carnes rebanadas, leche y derivados, entre otros, y producir la intoxicación estafilocócica con una ingesta mínima de 100 ng de toxina (Andrade *et al*. 2019).

A pesar que existe gran variedad de bacteriocinas, una de las más empleadas es la Nisina, polipéptido producido naturalmente por la bacteria acido láctica *Lactococus lactis* subsp. *lactis* (Sánchez *et al*. 2019). A nivel comercial la Nisina se ha utilizado como bioconservador de alimentos en más de 50 países con una efectividad comprobada y, además, es considerada como producto seguro con nivel GRAS ("Generally Recognized As Safe") y con autorización para su aplicación por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, según siglas en inglés) (Godoy *et al*. 2019).

Es de hacer mención, que en la actualidad, en Venezuela existe una variedad de productos lácteos artesanales como el queso blanco y queso crema, cuyas condiciones higiénicas en la manipulación y transporte de la leche, así como del proceso artesanal de fabricación del producto lácteo final pueden ser deficientes, incrementando el riesgo de contaminación con bacterias patógenas.

El efecto de Nisina para controlar *S. aureus* en quesos está ampliamente documentado a nivel nacional e internacional y su uso permitido por la norma General de Quesos venezolana COVENIN 1813:2000 y las normas internacionales (Codex Alimentarius 2011), no obstante, muchas veces las pequeñas empresas desconocen las ventajas de bioconservantes como la Nisina, cuya inversión resulta no sólo en la obtención de un producto libre de microorganismos patógenos evitando el riesgo de intoxicaciones o toxiinfecciones, sino también en la prolongación de la vida útil del producto sin afectar sus cualidades organolépticas, lo cual es importante para la industria láctea nacional. Por lo anterior, resulta necesaria la difusión de trabajos que evidencien los efectos beneficiosos de alternativas como la Nisina para la calidad e inocuidad, así como la vida útil de los productos lácteos.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto inhibidor de la Nisina, frente a variaciones de temperatura y pH, sobre el crecimiento de *S. aureus*, usando leche de larga duración (UHT, según sus siglas en inglés) como matriz alimentaria para inoculación experimental, en una fase inicial de estandarización para su aplicabilidad o uso, en leche cruda y/o pasteurizada, empleadas como materia prima para la elaboración de derivados lácteos artesanales.

METODOLOGÍA

Muestra

Estuvo constituida por 25 muestras de leche descremada de larga duración (UHT, según siglas en inglés), de una misma marca comercial, provenientes de cinco lotes diferentes de 1 litro, con vida útil de 5 meses, obtenida en establecimientos comerciales de Valencia, Estado Carabobo, Venezuela.

Previo al procedimiento de estandarización se realizó una evaluación de la calidad microbiológica de las muestras tanto a las que serían inoculadas artificialmente con el microorganismo objeto de estudio como a las empleadas como muestras controles. Los criterios microbiológicos establecidos por FONDONORMA 902 (COVENIN, 1987) para este tipo de producto envasado se basa en un número mínimo de 5 lotes y 5 muestras por lote para un total de 25 muestras.

Una vez recolectadas, las muestras fueron trasladadas al laboratorio en un recipiente isotérmico, y se mantuvieron a temperatura ambiente por un máximo de 12 horas hasta el momento de la contaminación artificial.

Es importante mencionar que la utilización de leche UHT para el presente estudio se debió a que en su proceso de elaboración se ejerce un control más riguroso de las condiciones de producción y procesamiento, lo que resulta en un producto más uniforme, especialmente en características fisicoquímicas y de estar libre de microorganismos de la microbiota de fondo que se encuentra en leche cruda y que puede enmascarar el resultado del efecto inhibidor de la Nisina sobre *S. aureus*, además, la cantidad de materia grasa en esta matriz, la cual puede variar dependiendo de múltiples factores, como la alimentación de las vacas, son factores que al momento de estandarizar técnicas dificultan el proceso. Sin embargo, se recomienda que una vez lista la estandarización en leche UHT se hagan ensayos en otros productos lácteos para observar si los resultados se pueden transpolar a las diferentes matrices.

Cepa

Se utilizó *S. aureus* ATCC 25923 para la contaminación artificial, suministrada por el Instituto Nacional de Higiene, Caracas-Venezuela (INH). Esta cepa fue conservada mediante repiques sucesivos en cuñas de agar nutritivo (HiMedia Laboratories, India) y conservadas a temperatura ambiente con la finalidad de mantenerla viable. La cepa era reactivada en caldo enriquecido Infusión Cerebro Corazón (BHI) (BBL™ Becton Dickinson and company. Sparks, USA) 24 horas previas a cada ensayo experimental. La identificación de *S. aureus* ATCC 25923 se realizó según lo indicado por FONDONORMA 1292 (COVENIN 1989), adicionado de solución de telurito-yema de huevo, con incubación a 35 °C durante 18-24 horas. Posteriormente, a las colonias sospechosas se les realizó tinción de Gram, pruebas de: catalasa, coagulasa, novobiocina de 5 µg, Dnasa y manitol salado (Madigan *et al*. 2004). Adicionalmente, se realizó una curva de crecimiento a la cepa de *S. aureus* tanto en caldo LB (Luria-Bertani, HiMedia Laboratories) como en leche líquida UHT (Ultra High Temperature, según siglas en inglés).

Preparación de la Nisina

Se preparó una solución patrón de Nisina a una concentración de 10.000 UI/mL, disolviendo 1g de Nisina comercial al 2,5 %, en 100 mL de HCl 0,02 M. La solución obtenida de Nisina registró un pH 2 y se ajustó a pH 4,9 con NaOH 1N y se esterilizó en un autoclave vertical (121 °C/5min). La solución madre de Nisina fue mantenida a 4 °C por 24 horas antes de su uso (COVENIN 2003). Posteriormente se midió 1 mL de la solución patrón de Nisina (10^6 UI/mL) para diluir en agua destilada estéril hasta alcanzar 500 UI/mL. La legislación venezolana señala un máximo de 10^3 UFC/g de *S. aureus* FONDONORMA 3822 (COVENIN 2003) y un máximo de 500 UI/g de Nisina FONDONORMA 1813 (COVENIN 2000).

Actividad inhibitoria de Nisina (500 UI/mL) sobre *S. aureus* ATCC 25923 (10^3UFC/mL)

Para verificar la actividad inhibitoria de la Nisina, se realizó suspensión en solución salina estéril de *S. aureus* ATCC 25923 hasta alcanzar una turbidez comparable con el Patrón McFarland 2 (1,2 x10^8 UFC/mL). Seguidamente se hicieron diluciones seriadas hasta obtener una concentración final de 10^3 UFC/mL. Se sembró en superficie utilizando la espátula de Drigalsky en agar Baird Parker (BD Diagnostic, Becton, Dickinson and Company. Germany) para verificar el recuento bacteriano empleando cuatro protocolos de ensayo, las cuales fueron realizadas por triplicado, respectivamente:

Ensayo 1 (Control Negativo). Siembra de muestra de Leche UHT sin inóculo experimental.

Ensayo 2 (Control de esterilidad de la Nisina). Siembra de alícuota de solución de Nisina (500 UI/mL) sin inóculo experimental.

Ensayo 3 (Control Positivo). Siembra de muestra de Leche UHT + *S. aureus* ATCC 25923 (10^3UFC/mL).

Ensayo 4 (Grupo Experimental). Siembra de muestra de Leche UHT + *S. aureus* ATCC 25923 + Nisina (500 UI/mL).

Cabe señalar que las repeticiones fueron realizadas con el fin de darle estrictez a los resultados dada la reproducibilidad de los mismos.

Todos los ensayos se evaluaron bajo el efecto de las siguientes condiciones de Temperatura: 8 ºC y 25 ºC a tiempo de incubación inicial (tiempo 0) y 30 minutos (tiempo 1). En relación a los valores de pH, sólo los ensayos 3 y 4 fueron estudiados bajo las condiciones de pH de 4,5 y 6,5 durante 0, 3, 6 y 24 horas. Las muestras de leche UHT presentaron un pH basal de 6,5. Se inocularon individualmente y se aplicaron los distintos tratamientos de forma individual y combinados. El efecto sobre la evolución del microorganismo se realizó mediante recuento en placa sobre agar Baird Parker utilizando un contador de colonias tipo Quebec.

Análisis de resultados

Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva (tablas y gráficos), asimismo se determinó la significancia de los resultados obtenidos empleando como herramienta el Software estadístico Statistix versión 8.0 así como la prueba de los signos de Wilcoxon U-Mann Whitney con un nivel de confianza del 95 % (Analytical Software 2003) para evaluar el efecto de la Nisina sobre el crecimiento de *S. aureus* sobre las diferentes variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1 muestra el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 (UFC/mL) en leche UHT en el tiempo cero de incubación. Se observa que tal como es de esperar, el mayor recuento bacteriano se reporta en el ensayo 3, pues el mismo no presenta el inhibidor Nisina. Siendo mayor a 25°C que a 8°C (P<0,05); hecho que no se observa en el ensayo 4, donde está presente la Nisina. En relación al crecimiento microbiano en los controles de leche UHT y Nisina (ensayos 1 y 2), en ninguno de los casos se observó presencia de células viables, lo que indica esterilidad y ausencia de microorganismos en dichas muestras.

El incremento de la población de *S. aureus* ATCC 25923 observado en el grupo experimental en ausencia de Nisina, indica que el microorganismo puede crecer en leche UHT aún refrigerada, por lo que existe una mayor probabilidad de que suceda a temperatura ambiente y en matrices como leche cruda y/o pasteurizada como materia prima para la elaboración de derivados lácteos artesanales. En este sentido, se ha reportado que *S. aureus* puede crecer a temperaturas entre 7°C y 48°C, con un óptimo de 37°C, por lo tanto, el almacenamiento inadecuado de la leche cruda, puede permitir que *S. aureus* crezca, además, un procesamiento mínimo o una pasteurización inadecuada pueden no eliminar este microorganismo en la leche cruda, permitiendo su crecimiento y multiplicación en la leche procesada o en los productos lácteos elaborados (Xie *et al*. 2020). Por otro lado, la reducción del número de células viables en la leche contaminada con *S. aureus* en el grupo experimental que contenía Nisina evidencia que la misma resultó favorable al ejercer un efecto inhibidor sobre el patógeno evaluado. Dicho efecto se debe a que la Nisina actúa sobre la membrana plasmática de los microorganismos, formando poros y desestabilizando la misma al actuar como un detergente y como consecuencia, causando la muerte del patógeno (Galván *et al*. 2020).

Por otra parte, cuando se evalúa el efecto de la temperatura durante los ensayos experimentales al tiempo 1 de incubación (30 minutos), se observa que en ausencia de la Nisina (ensayo 3) se reportó un mayor crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 a 25 °C, sin embargo, dicho incremento fue de una unidad logarítmica superior al observado en el tiempo cero (P<0,05). Entretanto, en el ensayo 4, es decir, en presencia de la Nisina, el crecimiento fue escaso, mostrando diferencias igualmente significativas entre los 8 °C y 25 °C (P<0,05).

Cuadro 1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (UFC/mL) en leche UHT en dos tiempos de incubación.

Tiempo de incubación	Ensayo	Temperatura 8 °C		Temperatura 25 °C		Estadístico U	*p*
		Mediana (UFC/mL)	Rango (UFC/mL)	Mediana (UFC/mL)	Rango (UFC/mL)		
0 min	1	< 1 x 10	0 - 1 x 10	< 1 x 10	0-1 x 10	15,000	0,9999 ns
	2	< 1 x 10	0 - 1 x 10	< 1 x 10	0-1 x 10	15,000	0,9999 ns
	3	$1,8 \times 10^2$	$1 - 2 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$3,8 - 4,8 \times 10^2$	25,000	0,0079 *
	4	< 1 x 10	0 - 1 x 10	< 1 x 10	<1 - 1,8 x 10	17,500	0,4444 ns
30 min	1	< 1 x 10	0 - < 1,0 x 10	< 1 x 10	0-1 x 10	15,000	0,9999 ns
	2	< 1 x 10	0 - < 1,0 x 10	< 1 x 10	0-1 x 10	15,000	0,9999 ns
	3	$1,5 \times 10^2$	$1 - 4 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$8,8 \times 10^2 - 1,6 \times 10^3$	25,000	0,0079 *
	4	< 1 x 10	< 1 - 1,1 x 10	1,8 x 10	<1 - 2,7 x 10	22,00	0,0397 *

UFC/mL= Unidades formadoras de colonias por mililitro; ns = No significativo; *Significativo al 95% de confianza

Es evidente que luego de 30 minutos de incubación el recuento bacteriano se incremente en ausencia de la Nisina, lo que evidencia la importancia de contar con herramientas como estos péptidos los cuales a bajas concentraciones son efectivos para inhibir microorganismos (Rendueles *et al*. 2022; Vidal *et al*. 2020). Adicionalmente, la Nisina ha mostrado inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* luego del procesamiento de leche cruda para la elaboración de queso durante ocho semanas o más (Verma *et al*. 2022). Aunque en los quesos con alto porcentaje de grasas, el efecto antimicrobiano de las bacteriocinas puede ser afectado debido al carácter anfipático de las mismas, que podrían interactuar con los lípidos. En estos productos particulares, deben tenerse en cuenta otras estrategias para aumentar la efectividad de la Nisina (Bautista y Barrado 2023).

Seguidamente, la comparación del efecto de la temperatura en presencia y ausencia de Nisina se reportan en la Cuadro 2. En general, se observa que, en todos los casos, el crecimiento bacteriano en ausencia de Nisina fue superior a una unidad logarítmica respecto al crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de Nisina, siendo el nivel máximo de crecimiento a 25 °C por 30 minutos de incubación, mientras que, en presencia de la Nisina, se observa que el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 fue invariable a los 8°C en ambos tiempos evaluados, pero mostró un incremento mínimo a los 30 minutos de incubación

Cuadro 2. Comparación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (UFC/mL) en leche UHT en presencia y ausencia de Nisina.

Tiempo de incubación (min)	Temperatura 8 °C				Temperatura 25 °C			
	Ausencia de Nisina# (UFC/mL)	Presencia de Nisina# (UFC/mL)	Estadístico U	p	Ausencia de Nisina# (UFC/mL)	Presencia de Nisina# (UFC/mL)	Estadístico U	p
0	$1,8 \times 10^2$	<1 x 10	25,000	0,0079*	$4,3 \times 10^2$	<1 x 10	25,000	0,0075*
30	$1,5 \times 10^2$	<1 x 10	25,000	0,0070*	$1,2 \times 10^3$	1,8 x 10	25,000	0,0078*

valores expresados como mediana; UFC/mL= Unidades formadoras de colonias por mililitro; * Significativo al 95% de confianza

a 25°C. Esto coincide con Henderson *et al.* (2020) y Song *et al*. (2021), quienes reportaron un efecto bactericida transitorio contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*, respectivamente, seguido de un nuevo crecimiento de células en matrices alimentarias y medios de laboratorio suplementados con Nisina.

Dentro de las razones posibles para el nuevo crecimiento del patógeno después de una reducción significativa inicial, se incluyen, entre otras, (i) las condiciones intrínsecas a la matriz del alimento que disminuyen la disponibilidad o actividad de la Nisina, y (ii) el estado fisiológico de las células que podría aumentar la tasa de supervivencia del cultivo. Por ejemplo, la unión de la Nisina a los componentes de la matriz alimentaria, como la grasa, lo cual puede disminuir la disponibilidad de Nisina y, por tanto, su capacidad para unirse y matar la bacteria (Henderson *et al.* 2020). Es importante señalar que la influencia de la temperatura sobre la eficacia de inactivación de la Nisina es controvertida, mostrando incluso por ejemplo trabajos como el de Song *et al*. (2021), donde la inactivación de *S. aureus* por Nisina fue inicialmente rápida y luego lenta, pero en general, no hubo diferencias significativas en la reducción de *S. aureus* por Nisina bajo diferentes temperaturas de tratamiento (de 0 a 45°C).

Por otro lado, la Figura 1A evidencia el efecto del pH 4,5 sobre el crecimiento de la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 en leche UHT en presencia y ausencia de Nisina (500 UI/ mL). Se puede observar que si bien, el crecimiento en número de UFC/mL de *S. aureus* ATCC 25923 en ausencia de Nisina fue notablemente mayor al del ensayo con presencia de la misma, en ambos tiende a disminuir progresivamente, hasta llegar a bajos recuentos a las 24 horas de incubación. Esto indica que el pH 4,5 incide negativamente en el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 con y sin Nisina, sin embargo, su efecto no es de inmediato pues se requieren más de 6 horas de incubación para disminuir el crecimiento del patógeno, siendo totalmente completa la inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de la Nisina.

Estos resultados se justifican debido a que el aumento de la actividad antibacteriana de la Nisina a pH bajo es habitual, y se atribuye a que la actividad y estabilidad de la bacteriocina están estrechamente relacionadas con su estructura proteica. Por lo tanto, su actividad puede ser alterada por el pH. Por lo general, la Nisina es más estable a pH bajo (debido a que la proteína se protona a ese pH), por lo que mantiene su conformación estructural original (Li *et al*. 2021; Song *et al*. 2021).

Es importante aclarar que el efecto favorable de la disminución del pH sobre la actividad de la Nisina no se puede adoptar de forma absoluta ya que esto varía de acuerdo al tipo de alimento, pues la composición y estructura de éste tiene un significativo efecto dinámico y factores de interacción importantes, pues los ingredientes presentes pueden favorecer o inhibir la acción de la bacteriocina como la glucosa o ácidos,

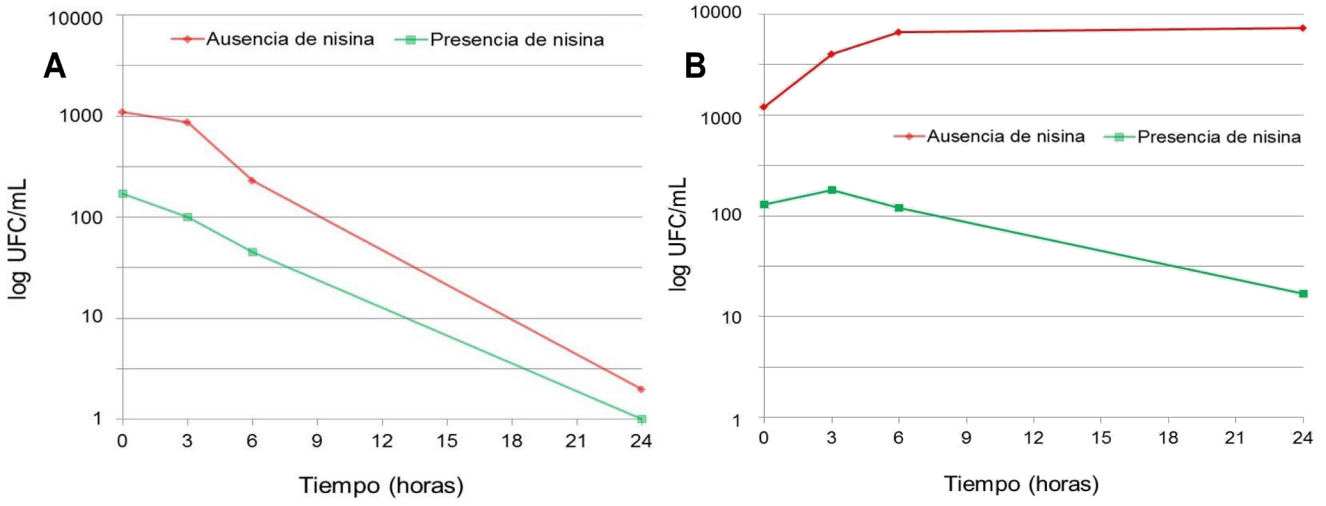


Figura 1. Comportamiento de la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en leche UHT a pH 4,5 (A) y 6,5 (B) en presencia y ausencia de Nisina.

en la literatura se ha señalado que la estructura del alimento ejerce un efecto dinámico en el crecimiento de las bacterias y la difusión de las sustancias inhibitorias (Kirazli y Tunca 2022).

Asimismo, la Figura 1B muestra el efecto del pH 6,5 sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 en leche UHT en ambos grupos experimentales. Se observa que, en ausencia de Nisina, el pH no tiene incidencia en el crecimiento pues se registró un crecimiento progresivo del microorganismo. Sin embargo, en presencia de Nisina, el pH 6,5 influyó negativamente, logrando un descenso del crecimiento, a partir de las 3 horas, no obstante, sin alcanzar la inhibición bacteriana total obtenida en el ensayo con Nisina a pH 4,5.

Se sabe que *S. aureus* puede crecer en un intervalo de pH de 4,0 a 9,8 siendo el pH óptimo para su crecimiento, el comprendido entre 6,0 y 7,0 (Andrade *et al*. 2019), permitiendo, por tanto, una mayor proliferación de esta bacteria en la leche UHT a un pH de 6,5 sin Nisina. En cuanto al efecto de la Nisina sobre el crecimiento del patógeno, a pH 6,5 se presentó una disminución de S. *aureus,* pero la actividad antimicrobiana de la Nisina no eliminó totalmente al patógeno. Tales resultados se explican ya que la Nisina es menos estable a un pH neutro o casi neutro, tal como el implementado en el ensayo, es decir, cuando aumenta el pH, la protonación de la Nisina se reduce y se polimeriza, lo que causa variaciones en su estructura y, por tanto, en la solubilidad y estabilidad de la Nisina, afectando su actividad antimicrobiana en la matriz alimenticia (Henderson *et al.* 2020).

Cabe destacar que, en todos los tiempos evaluados (de 0 a las 24 horas), tanto para pH 4,5 como para 6,5 se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en presencia y ausencia de la Nisina (P<0,05), siendo notablemente superior el número de colonias en ausencia de la bacteriocina evaluada (Cuadro 3).

Finalmente, se puede decir que el pH 4,5 favoreció la actividad de la Nisina obteniéndose una mayor acción inhibitoria de *S. aureus* en comparación con el pH 6,5 donde no fue posible la eliminación total del patógeno (100%) a las 24 horas tal como ocurrió a pH 4,5. El aumento de la actividad antibacteriana a pH bajo es habitual, de hecho, a pH 3 la Nisina posee la máxima solubilidad y estabilidad y se atribuye a que el pH bajo facilita el transporte de la bacteriocina a través de la pared celular (Ibarra *et al*. 2020). Además, Bautista y Barrado 2023 señalan que las bacteriocinas como la Nisina son estables a pH ácido debido a su adaptación al entorno natural en el que las BAL las producen.

El presente estudio evidenció una disminución de los recuentos de *S. aureus* bajo condiciones de temperatura de refrigeración así como a un valor de pH 4,5 por lo que, en tales condiciones, la aplicación de la Nisina resultaría en una mayor inocuidad así como una prolongación en el tiempo de vida útil del producto lácteo, sobre todo en productos artesanales elaborados con leche cruda que puede estar contaminada con un microorganismo patógeno o que debido a malas prácticas higiénicas en la manipulación, distribución y almacenamiento de la materia prima, resulte contaminado el producto final (Alvares *et al*. 2022). Adicionalmente, los resultados

Cuadro 3. Comparación del efecto del pH sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (UFC/mL) en leche UHT en presencia y ausencia de Nisina.

	pH= 4,5				pH= 6,5			
Tiempo de incubación (horas)	**Ausencia de Nisina[#]** (UFC/mL)	**Presencia de Nisina[#]** (UFC/mL)	**Estadístico U**	***p***	**Ausencia de Nisina[#]** (UFC/mL)	**Presencia de Nisina[#]** (UFC/mL)	**Estadístico U**	***p***
0	$1,1 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$	25,000	0,0075*	$1,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2$	25,000	0,0075*
3	$8,7 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	25,000	0,0070*	$4,0 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	25,000	0,0070*
6	$2,3 \times 10^2$	4,5 x 10	25,000	0,0070*	$6,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	25,000	0,0070*
24	<1 x 10	<1 x 10	15,000	0,9990	$7,3 \times 10^3$	1,7 x 10	25,000	0,0079*

[#]valores expresados como mediana; UFC/mL= Unidades formadoras de colonias por mililitro; * Significativo al 95% de confianza

obtenidos muestran que resulta necesario evaluar estrategias alternativas para superar las limitaciones de la Nisina cuando se use en productos lácteos como el queso fresco, ampliamente consumido en el país y cuyo pH cercano a la neutralidad, así como los componentes de la matriz alimentaria, pueden afectar la acción inhibitoria de la Nisina. Entre las alternativas se encuentran, la encapsulación de Nisina (Pandit 2021), así como la combinación con otros antimicrobianos (Sánchez *et al*. 2019), las cuales mejoren la eficacia del tratamiento y disminuyan la cantidad de microorganismos patógenos y alterantes.

CONCLUSIÓN

El presente estudio evidenció de manera experimental el efecto inhibidor de la Nisina al generar una disminución de los recuentos de *S. aureus* bajo condiciones de temperatura de refrigeración, así como a pH 4,5 en leche UHT contaminada artificialmente, por lo que, en tales condiciones, la aplicación de la Nisina en leche cruda y/o pasteurizada, empleadas como materia prima para la elaboración de derivados lácteos artesanales resultaría en una mayor inocuidad del alimento. Asimismo, resulta posible su uso para la inhibición de otros microorganismos patógenos en otras matrices alimentarias.

LITERATURA CITADA

Alvarez, B; Doria, M; Hodeg, V; Simanca, M; Pastrana, Y; Paula, C. 2022. Efecto de la Nisina en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y en las propiedades sensoriales del queso costeño. Revista mexicana de ciencias pecuarias 13(1): 272-286. https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i1.5741

Analytical Software. 2003. Statistix Version 8: 0: user's manual. Analytical Software, Tallahassee, Florida, United States of America. 333 pp.

Andrade, F; Medeiros, B; Barbosa, T; Silva, M. 2019. Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão. Revista de Ciencias Médicas Biológicas 18 (1): 89-93. http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v18i1.25215

Bautista, A; Barrado, A. 2023. Bacteriocinas como bioconservador alimentario: características generales y aplicación en alimentos. Pubsaúde 12 (a366): 1-9. https://dx.doi.org/10.31533/pubsaude12.a366

Codex Alimentarius. 2011. Leche y sus Productos Lácteos, Segunda edición. Organización Mundial de la salud y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma. 267p. https://bit.ly/3WnPGVD

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). 1987. "Alimentos. Método para recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de petri". Norma 902. 1ra revisión. Caracas, Venezuela. FONDONORMA. 22 oct. 9 p.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). 1989. Alimentos. Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*. Norma 1292. 1ra rev. Caracas, Venezuela. FONDONORMA. 22 oct. 9 p.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). 2000. Norma General de Quesos. Norma 1813. 2da rev. Caracas, Venezuela. FONDONORMA. 25 oct. 8p.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). 2003. Queso de pasta hilada. Norma 3822. Caracas, Venezuela. FONDONORMA. 29 oct. 9p.

Daba, G; Elnahas, M; Elkhateeb, W. 2022. Beyond biopreservatives, bacteriocins biotechnological applications: History, current status, and promising potentials. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 39: 102248. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102248

Galván, I; McKay, B; Wong, A; Cheetham, J; Bean, C; Golshani, A; Smith, M. 2020. Mode of action of Nisin on *Escherichia coli*. Canadian journal of microbiology 66(2): 161-168. https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0315

Godoy, F; Pitts, B; Stewart, P; Mantovani, H. 2019. Nisin penetration and efficacy against *Staphylococcus aureus* biofilms under continuous-flow conditions. Microbiology 165(7): 761-771. https://doi.org/10.1099/mic.0.000804

Henderson, L; Erazo, B; Skeens, J; Kent, D; Murphy, S; Wiedmann, M; Guarigli, V. 2020. Nevertheless, she resisted–role of the environment on *Listeria monocytogenes* sensitivity to Nisin treatment in a laboratory cheese model. Frontiers in microbiology 11 (635): 1-5. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00635

Ibarra, N; El-Haddad, D; Miller; M; Layal, K. 2020. Invited review: Advances in Nisin use for preservation of dairy products. Journal of Dairy Science 103 (3): 2041-2052. https://doi.org/10.3168/jds.2019-17498

Kirazli, S; Tunca, S. 2022. Nisin I and gilaburu (*Viburnum opulus* L.) combination is a cost-effective way to control foodborne *Staphylococcus aureus*. Food Control 142: 213-215. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109213

Li, W; Liu, Y; Zhang, Q; Tan, Z; Jia, S. 2021. Effect of $CaCl_2$ on the stability and antimicrobial activity of Nisin. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 705 (1): 1-9. https://doi.org/10.1088/1755-1315/705/1/012011

Madigan, M; Martinko, J; Parker, J; Brock. 2004. Biología de los Microorganismos – 10ma Edición. 1136 pp.

Montgomery, H; Haughey, S; Elliott, C. 2020. Recent food safety and fraud issues within the dairy supply chain (2015–2019). Global Food Security 26: 1-10. https://doi.org/10.1016/j.gfs.2020.100447

Owusu, J; Akabanda, F; Agyei, D; Jespersen, L. 2020. Microbial safety of milk production and fermented dairy products in Africa. Microorganisms 8 (752):1-24 https://doi.org/10.3390/microorganisms8050752

Pandit, R. 2021. Biocompatible polymers impregnated with Nisin and nanoparticles for food preservation. In Biopolymer-Based Nano Films. Elsevier. 85-98 pp. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823381-8.00010-7

Rendueles, C; Catarina, A; Escobedo, S; Fernández, L; Rodríguez, A; García, P; Martínez, B. 2022. Combined use of bacteriocins and bacteriophages as food biopreservatives. A review. International Journal of Food Microbiology 268: 109611. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109611

Sánchez, M; Salgado, M; San Miguel, Á; Pachón, J; Rodríguez, E; Pastor, M; Cabrero, P. 2019. Nisina (N 234), aditivo utilizado como conservante en alimentos. Gac Med Bilbao 116: 166-173. https://bit.ly/4fZDLEh

Song, Y; Lu, Y; Bi, X; Chen, L; Liu, L; Che, Z. 2021. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by the combined treatments of ultrasound and Nisin in nutrient broth and milk. Engineering Food 2(3): 140-146. https://doi.org/10.2991/efood.k.210708.001

Verma, D; Thakur, M; Singh, S; Tripathy, S; Gupta, A; Baranwal D; Patel, A; Shah, N; Utama, G. 2022. Bacteriocins as antimicrobial and preservative agents in food: Biosynthesis, separation and application. Food Bioscience, 46: 101594. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101594

Vidal, D; Torres, L; Negrete, Y. 2020. Nisina: Una bioalternativa para la reducción de las intoxicaciones alimentarias en el caribe colombiano. Revista LASIRC 1 (9): 59-66. https://bit.ly/3DXVkYj

Xie, Z; Peng, Y; Li, C; Luo, X; Wei, Z; Li, X; Huang, L. 2020. Growth kinetics of Staphylococcus aureus and background microorganisms in camel milk. Journal of dairy science 103(11): 9958-9968. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18616